

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001883

International filing date: 23 February 2005 (23.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2004A000363
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 29 April 2005 (29.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

803 PCT

PCT/EP05/01883



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

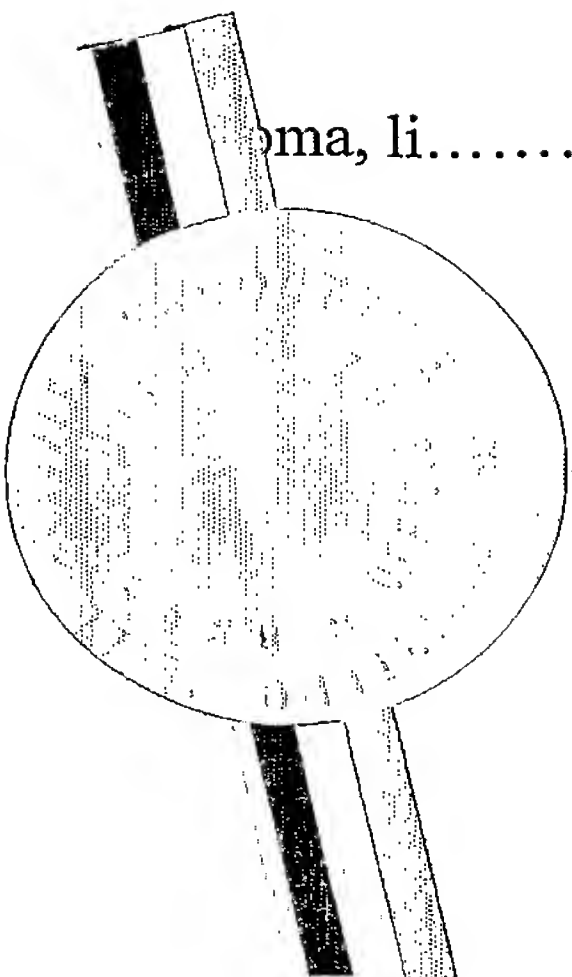


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000363**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

23 MAR. 2005

oma, li.....



IL FUNZIONARIO

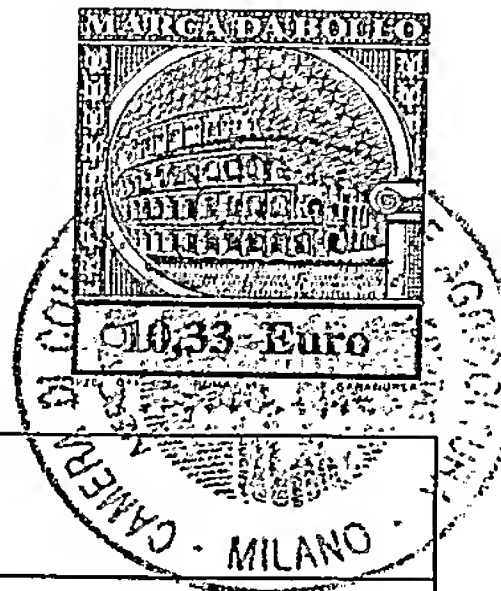
Paolo / Hans

Paola Giuliano

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° MI 2004 A 0 0 0 3 6 3



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 03064870151
INDIRIZZO COMPLETO	A4	MILANO		

B. RECAPITO OBBLIGATORIO
IN MANCANZA DI MANDATARIO

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)
INDIRIZZO	B1	
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B2	
	B3	

C. TITOLO

	C1	"CASSETTA PER L'ESPRESSIONE DI ACIDI NUCLEICI NEGLI STOMI"
--	----	--

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	TONELLI CHIARA
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	GALBIATI MASSIMO
NAZIONALITÀ	D2	

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO
--------------------------------	-------------



MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM


LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPOVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART. 76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N. 455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	BIANCHETTI GIUSEPPE ED ALTRI
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Rossini 8
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 MILANO (MI)
TELEFONO		02/76021218
FAX		02/783078 - 02/76024366
E-MAIL		mailbox@scb.it
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		22
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		07
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	SI		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(EURO)		
ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE	
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI	DUECENTONOVANTUNO/80#	
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	27/02/2004		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	BANFI PAOLO		

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2004 A 0 0 0 3 6 3	
C.C.I.A.A. DI	MILANO	COD. 15
IN DATA	27 FEB. 2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N. 00	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE		
IL DEPOSITANTE		L'UFFICIALE ROGANTE ROSA SCOGLIO

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

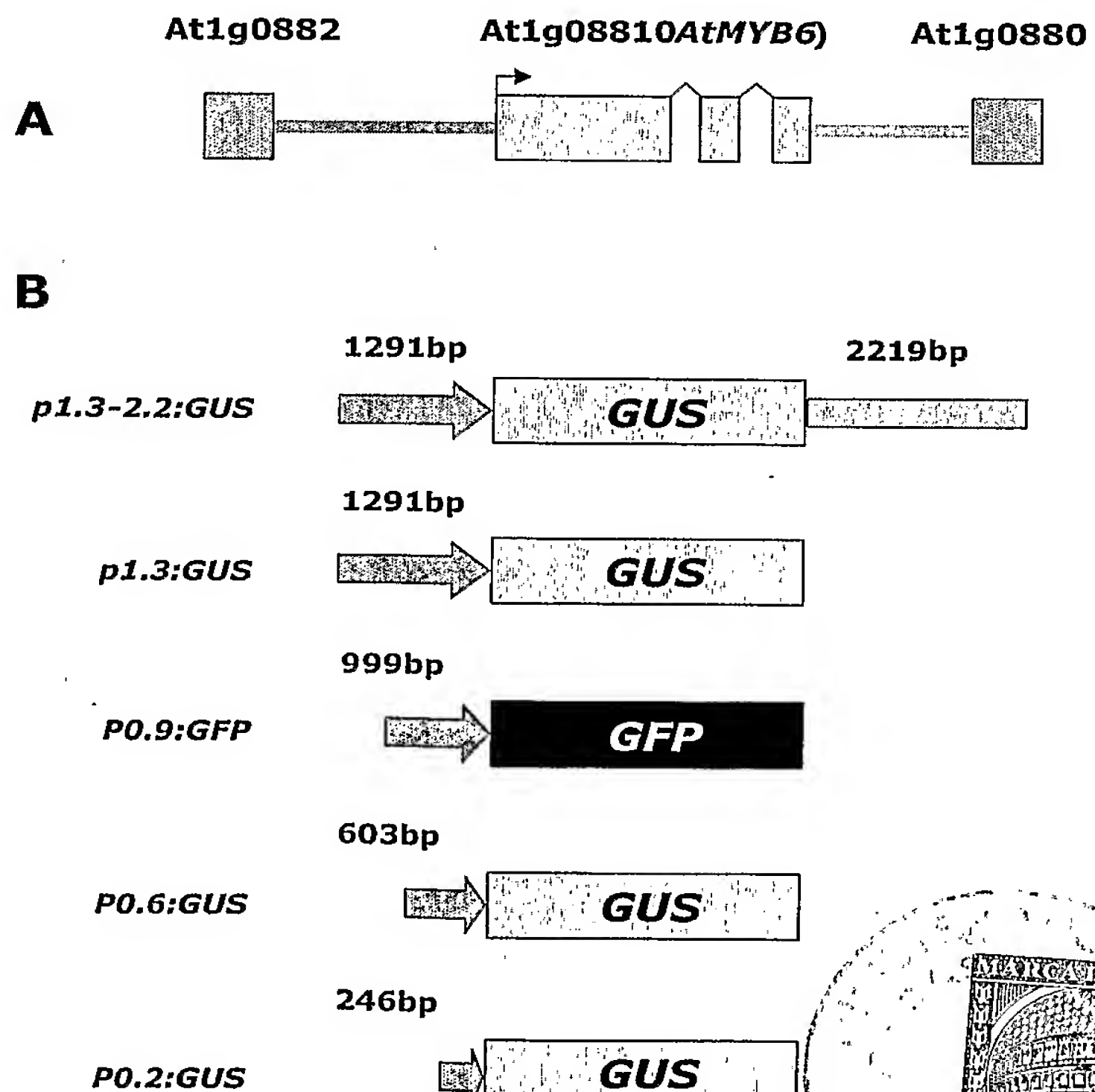
NUMERO DI DOMANDA:	<i>MI 2004 A 0 0 0 3 6 3</i>	DATA DI DEPOSITO:	<i>27 FEB. 2004</i>
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO			
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO Milano			
C. TITOLO			
"CASSETTA PER L'ESPRESSIONE DI ACIDI NUCLEICI NEGLI STOMI"			

O. RIASSUNTO

Si descrive un costrutto genico o cassetta per l'espressione genica selettiva in cellule di guardia degli stomi e il suo uso per la regolazione dell'apertura stomatica nelle piante.

P. DISEGNO PRINCIPALE

FIGURA 2



FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

BANFI PAOLO

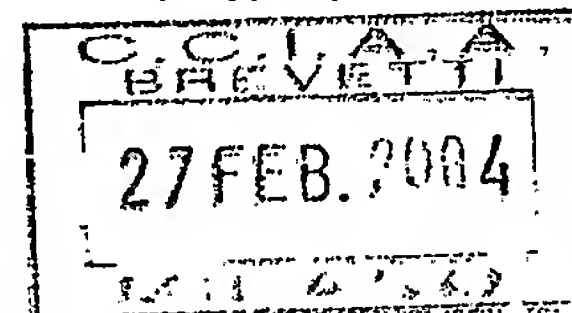


7170 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

PB/mc **“CASSETTA PER L'ESPRESSIONE DI ACIDI NUCLEICI NEGLI
STOMI”**

a nome : **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

con sede in: Milano



* * * MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

La presente invenzione riguarda l'espressione di acidi nucleici ricombinanti in piante. Più precisamente viene fornito un promotore per l'espressione selettiva di geni in cellule di guardia degli stomi, costrutti genici contenenti detto promotore, i relativi vettori d'espressione e piante trasformate con gli stessi. L'espressione selettiva di geni nelle cellule di guardia degli stomi consente di regolarne lo stato di apertura/chiusura modificando di conseguenza la capacità di adattamento delle piante alle diverse condizioni climatiche o ambientali.

INTRODUZIONE

Utilizzo di promotori tessuto-specifici nella costituzione di piante transgeniche

I recenti progressi nelle tecniche di trasformazione offrono una nuova opportunità per il miglioramento delle specie coltivate. Attraverso l'approccio transgenico è possibile introdurre in pianta nuovi caratteri che concorrono ad aumentarne la produttività, ad incrementare la qualità dei prodotti, a favorire l'adattamento ad avverse condizioni climatiche o ad incrementare la tolleranza verso i patogeni. È inoltre possibile utilizzare le piante per la produzione di proteine ricombinanti non vegetali, al fine di produrre ad esempio biopolimeri, sostanze medicinali o addirittura vaccini ed anticorpi

(L. Lanfranco, Riv Biol. 2003, 96: 31-54). (Dunwell JM, J. Exp. Bot., 2000, 51:487-496).

La possibilità di produrre proteine ricombinanti in pianta richiede l'utilizzo di promotori in grado di garantire la corretta espressione dei transgeni nei tessuti vegetali. Fino ad oggi un numero abbastanza limitato di promotori è stato utilizzato nella costituzione di piante transgeniche. La maggior parte di questi è rappresentata da promotori costitutivi, quali ad esempio il promotore 35S del virus del mosaico di cavolfiore (*CaMV35S*) (Odell et al., Nature, 1985, 313:810-812) o il promotore della ubiquitina (Holtorf et al., Plant Mol. Biol., 1995, 29:637-646).

Tali promotori presentano lo svantaggio di essere attivi in quasi tutti i tessuti della pianta, non consentendo di limitare l'espressione del transgene a particolari organi o fasi di sviluppo della linea transgenica.

Al contrario, promotori tessuto-specifici, offrono la possibilità di localizzare l'accumulo di proteina ricombinante in determinati tessuti od organi. Ad esempio, promotori di geni coinvolti nell'accumulo di sostanze di riserva nel seme, quali quello della faseolina (Bustos et al., Plant Cell, 1989, 1:839-853), o della 2S Albumina (Joseffson et al., J. Biol. Chem., 1987, 262:12196-12201) determinano l'espressione seme-specifica dei transgeni sottoposti al loro controllo. Il promotore della subunità piccola della Rubisco od il promotore ST-LSI di patata determinano un'espressione del transgene specifica per le foglie (Stockhaus et al., EMBO J., 1989, 8:2445). Sebbene esistano in letteratura molti altri esempi di promotori attivi in particolari tessuti od organi, ben pochi promotori specifici per un determinato tipo cellulare sono fino ad oggi stati identificati nei vegetali. Tali sequenze

regolatrici sono di particolare importanza in quanto consentirebbero di localizzare l'espressione dei transgeni in cellule ben distinte all'interno di un organo vegetale.

Gli stomi: anatomia e funzione

Gli organi aerei delle piante terrestri presentano sulla loro superficie piccole aperture denominate stomi. Queste strutture svolgono un ruolo essenziale nel regolare gli scambi gassosi tra i tessuti della pianta e l'atmosfera, consentendo da un lato l'influsso di CO_2 , necessaria per la fotosintesi, e dall'altra la perdita di acqua per traspirazione. Ogni stoma è costituito da due cellule epidermiche altamente specializzate, denominate cellule di guardia, che con il loro movimento determinano l'apertura e la chiusura della rima stomatica (FIGURA 1).

Il grado di apertura degli stomi, riflette il delicato compromesso tra il fabbisogno fotosintetico di CO_2 e la disponibilità di acqua. Non sorprende quindi che le piante terrestri abbiano evoluto sofisticati meccanismi di regolazione che modulano il processo di apertura e di chiusura degli stomi in risposta a stimoli ambientali e a segnali endogeni (Wilmer and Fricker, 1996, in Stomata, Ed Chapman and Hall, London, pp1-375).

Il movimento delle cellule di guardia è determinato da cambiamenti di volume indotti da variazioni di turgore. Questi ultimi sono a loro volta determinati dall'influsso od efflusso di soluti inorganici, potassio (K^+) e cloro (Cl^-), od organici, saccarosio e malato, nel lume cellulare (Schroeder et al, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001, 52:627-6658).

Condizioni favorevoli all'attività fotosintetica, quali la presenza di luce e di elevate concentrazioni di CO_2 determinano l'accumulo di tali soluti nelle

cellule di guardia, il cui conseguente aumento di turgore induce l'apertura dello stoma (FIGURA 1A).

Al contrario, in condizioni di carenza idrica si osserva nella pianta l'accumulo di acido abscissico (ABA), un fitormone in grado di indurre una rapida diminuzione di turgore delle cellule di guardia, attraverso l'efflusso di K^+ , Cl^- , saccarosio e la conversione di malato in amido, causando così la chiusura della rima stomatica (FIGURA 1B).

La riduzione dell'apertura stomatica, mediata dall'accumulo di ABA, rappresenta una prima e fondamentale risposta di adattamento della pianta a condizioni di stress idrico, in quanto consente di minimizzare la perdita di acqua per traspirazione (Wilkinson and Davies, Plant Cell Env., 2002, 25:195-210). Di recente, attraverso approcci farmacologici e genetici, sono stati identificati molti dei componenti della cascata di trasduzione del segnale dell'ABA, a livello delle cellule di guardia.

Nella chiusura degli stomi indotta da ABA intervengono l'aumento della concentrazione citosolica del Ca^{++} , l'attivazione di canali anionici, variazioni del pH citoplasmatico, la modificazione dell'attività di canali del potassio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, la regolazione di proteine ad attività fosfatasica e chinasi, e di altre specie proteiche tra cui, G-protein eteromeriche, farnesiltransferasi e mRNA cap-binding protein (Schroeder et al, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001, 52:627-6658).

La possibilità di alterare i livelli di una o più componenti del meccanismo di trasduzione del segnale ormonale negli stomi può quindi fornire uno strumento per intervenire direttamente sulla apertura/chiusura degli stessi, concorrendo alla creazione di piante coltivate in grado di ottimizzare l'influsso



di CO₂ e di meglio adattarsi a condizioni di carenza idrica.

STATO DELL'ARTE

La modificazione della normale risposta fisiologica delle cellule di guardia agli stimoli ambientali si basa sulla possibilità di modulare l'espressione di regolatori positivi o negativi della trasduzione del segnale dell'ABA negli stomi. Molte delle componenti coinvolte nel meccanismo di chiusura degli stomi mediata da ABA sono oggi note. Tuttavia, l'approccio biotecnologico alla manipolazione dell'attività stomatica è limitato dalla ridotta disponibilità di promotori specifici per le cellule di guardia.

Sebbene siano state descritte in letteratura diverse sequenze promotrici attive in questo tipo cellulare, nessuna di queste ha dimostrato una sufficiente specificità. I promotori di alcuni geni di *Arabidopsis* coinvolti nella regolazione dell'apertura stomatica quali ad esempio *Osm1* (Zhu et al., Plant Cell, 2002, 14:3009-3028), *Abh1* (Hugouvieux et al., Cell, 2001, 106:477-487), *Rac1* (Lemichez et al., Genes Dev., 2001, 15:1808-1816), *Kat1* (Anderson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 89:3736-3740), *Ost1* (Mustilli et al., Plant Cell, 2002, 14:3089-3099), *Chl1* (Guo et al., Plant Cell, 2001, 13:1761-1777), si sono dimostrati attivi non soltanto nelle cellule di guardia, ma anche in altri tipi cellulari ed organi della pianta. Questo limita notevolmente un loro possibile impiego per la costituzione di piante transgeniche con una modificata attività stomatica. Infatti, l'ABA, oltre a modulare la chiusura degli stomi, regola molti aspetti della fisiologia e dello sviluppo della pianta, tra cui la dormienza dei semi, la sintesi di proteine e lipidi di riserva, la transizione di fase, e la risposta a ferite o patogeni (Finkelstein et al., Plant Cell, 2002, S15-S45).

L'utilizzo di tali promotori per l'espressione ectopica di regolatori della trasduzione del segnale ormonale potrebbe indurre un'alterata risposta in diversi tessuti ed organi della pianta, oltre che nelle cellule di guardia degli stomi. Da qui la possibilità di causare difetti ed anomalie nella fisiologia della pianta tali da comprometterne la normale crescita e capacità produttiva.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato un metodo per l'espressione selettiva di transgeni nelle cellule di guardia degli stomi attraverso l'uso di sequenze promotrici del gene di *Arabidopsis thaliana AtMYB60* (At1g08810).

Oggetto della presente invenzione è un costrutto genico o cassetta per l'espressione genica selettiva in cellule di guardia degli stomi, contenente un gene diverso da *AtMYB60* (di seguito "gene eterologo") funzionalmente legato alla sequenza promotrice di *AtMYB60* specificata in SEQ ID N. 1 (FIG. 7), a suoi frammenti o varianti con identità di sequenza di almeno l'80%, preferibilmente almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95%, purché questi mantengano l'attività di promotori della trascrizione del gene eterologo. Preferibilmente la sequenza del promotore comprende i nucleotidi 1091-1291 (200 nt), più preferibilmente i nucleotidi 1041-1291 (250 nt) di SEQ ID N. 1. Il costrutto genico secondo l'invenzione può inoltre contenere elementi coinvolti nella regolazione della trascrizione, quali introni, siti di poliadenilazione all'estremità 3' del gene eterologo, attivatori o intensificatori ("enhancers") della trascrizione, sequenze di terminazione, marker di selezione, sequenze guida e altri.

Qualsiasi gene, a esclusione di *AtMYB60* (At1g08810), può essere funzionalmente legato al promotore secondo l'invenzione. Con il termine "operativamente" o "funzionalmente legato" si intende che il promotore e

l'acido nucleico eterologo sono orientati in modo tale che il promotore possa dirigere l'espressione dell'acido nucleico eterologo, generalmente in direzione 5'-3'. Preferibilmente il gene o acido nucleico eterologo codifica una proteina o un trascritto di RNA - per esempio un RNA antisenso - che possa favorire una funzione, regolare un effetto o migliorare una proprietà della pianta ospite. In considerazione della selettività dimostrata dalla cassetta d'espressione per le cellule di guardia degli stomi, il gene eterologo o il prodotto da esso codificato è preferibilmente coinvolto nella via di segnalazione intracellulare modulata dall'acido abscissico (ABA) e dunque nel meccanismo di regolazione dello stato di apertura o chiusura degli stomi. Esempi di geni coinvolti nella regolazione dell'apertura stomatica sono *Osm1*, *Rac1*, *Kat1*, *Ost1* e *Chl1* (si veda sopra per i relativi riferimenti bibliografici).

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda vettori d'espressione contenenti i costrutti genici dell'invenzione. I vettori possono essere derivati da plasmidi, cosmidi, batteriofagi, virus, vettori per il trasferimento diretto del DNA o, preferibilmente, vettori per il trasferimento di DNA mediato da *Agrobacterium*. Questi ultimi possono essere di tipo integrativo o binario e possono contenere marker di selezione, per esempio geni per la resistenza agli antibiotici o erbicidi, o geni reporter per facilitare l'identificazione e la selezione delle cellule trasformate, o ancora sequenze regolatrici per l'espressione in piante. Esempi di trasferimento genico diretto comprendono la microiniezione in protoplasti, l'elettroporazione e la tecnica biolistica basata sul bombardamento della pianta con microparticelle ricoperte di DNA.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda piante transgeniche, sia mono- che dicotiledoni, loro semi o parti (vegetative e riproduttive)

contenenti i costrutti genici della presente invenzione. Le procedure per la trasformazione delle piante con vettori transgenici o con DNA nudo sono note all'esperto del settore. Per esempio, i semi allo stadio germinativo, le plantule o le piante adulte possono essere inoculati con *Agrobacterium* contenente il costrutto genico e fatti crescere in opportune condizioni.

Da un punto di vista applicativo, la possibilità di ottenere piante con una più efficiente regolazione stomatica rappresenta un importante strumento per la costituzione di specie in grado di rispondere più efficacemente ai cambiamenti delle condizioni climatiche (Schroeder et al., Nature, 2001, 410:327-330).

In particolare, per le specie coltivate in climi umidi, laddove la disponibilità di acqua non rappresenta un fattore limitante, risulta particolarmente utile poter inibire la risposta stimolata da ABA, al fine di incrementare il grado di apertura stomatica e, di conseguenza, massimizzare l'influsso di CO₂ per la fotosintesi.

Al contrario, per le specie agricole coltivate in regioni non irrigue soggette a temporanei o prolungati periodi di siccità, è possibile ridurre l'apertura stomatica al fine di minimizzare la perdita d'acqua per traspirazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Caratterizzazione della sequenza promotrice di AtMYB60 (At1g08810)

AtMYB60 codifica per un fattore di trascrizione appartenente alla vasta famiglia delle proteine MYB di tipo R2-R3 di *Arabidopsis*. Al fine di analizzare il profilo di espressione in piante di *Arabidopsis* wild-type, cresciute in condizioni standard, differenti porzioni della regione intergenica a monte del codone di inizio della traduzione e della regione intergenica a valle



del codone di stop, sono state clonate a monte e a valle dei geni reporter Green Fluorescent Protein (GFP) e β -glucoronidasi (GUS) (FIGURA 2B). I costrutti così ottenuti sono stati introdotti in *Arabidopsis* e le linee transgeniche risultanti sono state sottoposte ad analisi istologica per rilevare i domini di espressione dei geni reporter. In tutti i casi analizzati l'espressione dei geni reporter è stata rilevata unicamente nelle cellule di guardia in tutti gli organi aerei provvisti di stomi (FIGURE 3-6).

Linee trasformate con il costrutto p1.3-2.2:GUS

La sequenza complementare ed invertita corrispondente alla regione genomica del cromosoma 1 - secondo la nomenclatura in uso presso "The Arabidopsis Information Resource", disponibile al sito <http://www.arabidopsis.org> - compresa tra il nucleotide 2821639 (appartenente alla sequenza 3' UTR del gene At1g08820) ed il nucleotide 2820349 (appartenente alla sequenza 5' UTR del gene *AtMYB60* -At1g8810) è stata clonata a monte del gene reporter GUS (FIGURA 2A, B; FIGURA 7).

A valle dello stesso è stata inserita l'intera regione intergenica a valle di *AtMYB60*, compresa tra il suo codone di stop e la regione 5' UTR del gene At1g08800 (FIGURA 2A, B). Le regioni genomiche utilizzate in questo costrutto contengono l'intero promotore di *AtMYB60* ed eventuali elementi regolativi presenti nella regione 3'.

Piante T2, ottenute in seguito a trasformazione con il costrutto p1.3-2.2:GUS sono state poi analizzate per determinare i profili di espressione del gene reporter. La colorazione GUS è stata riscontrata soltanto nelle cellule di guardia degli stomi in tutti gli organi della pianta provvisti di tali strutture ed in tutti gli stadi di sviluppo analizzati (FIGURA 3). Di seguito viene

riportata una descrizione dettagliata dei risultati ottenuti relativamente alle diverse parti della pianta ed alle fasi analizzate.

Plantule

Sono state analizzate plantule di 4 e 7 giorni, allo stadio cioè di cotiledoni espansi e in corrispondenza della comparsa delle prime foglie, rispettivamente. L'osservazione ha permesso di visualizzare una forte colorazione GUS a livello delle cellule di guardia degli stomi, sia nei cotiledoni e nelle prime foglie, che nell'ipocotile (FIGURA 3).

Nessuna colorazione è stata riscontrata nella radice primaria e nelle sue ramificazioni laterali.

Pianta adulta

Sono state analizzate piante di circa 7 settimane a livello di diversi organi, appartenenti sia a strutture vegetative che riproduttive. Nel primo caso si è riscontrata colorazione GUS nelle cellule di guardia degli stomi in foglie della rosetta basale, foglie cauline e steli (FIGURA 4A, B, C).

Per quanto concerne gli organi dell'apparato florale, l'espressione del gene *reporter GUS* è stata rilevata a livello delle cellule di guardia degli stomi di sepali, pistillo, antere e nelle silique immature (FIGURA 4D, E, F, G). L'osservazione dei petali, dove le strutture stomatiche sono assenti, non ha messo in evidenza alcuna colorazione.

Linee trasformate con i costrutti p1.3:GUS, p0.9:GFP, p0.6:GUS, p0.2:GUS

Al fine di confermare i dati ottenuti da piante trasformate con il costrutto *p1.3-2.2:GUS* e meglio definire la regione genomica necessaria e sufficiente a determinare l'espressione stoma specifica del gene reporter, sono

stati costituiti i seguenti costrutti (FIGURA 2B):

- *p1.3:GUS*, contenente la stessa regione intergenica a monte di *AtMYB60* utilizzata nel costrutto *p1.3-2.2GUS*, clonata in fronte al reporter GUS;
- *p0.9:GFP*, contenente 999bp della regione genomica a monte di *AtMYB60* clonata in fronte al reporter GFP (tale costrutto è stato realizzato per valutare l'espressione di *AtMYB60* attraverso un differente reporter che consentisse un'analisi tramite microscopia confocale);
- *p0.6:GUS*, contenente 603bp della regione genomica a monte di *AtMYB60* clonata in fronte al reporter GUS;
- *p0.2:GUS*, contenente 246bp della regione genomica a monte di *AtMYB60* clonata in fronte al reporter GUS.

Come evidenziato in FIGURA 5, tutti i costrutti analizzati hanno dato luogo allo stesso profilo di espressione rilevato nelle piante trasformate con il costrutto *p1.3-2.2:GUS*. La presenza di entrambi i reporter è stata riscontrata unicamente nelle cellule di guardia, in tutte le parti della plantula e della pianta adulta provviste di aperture stomatiche.

In particolare, l'analisi al microscopio confocale effettuata sui tessuti delle linee trasformate con il costrutto *p0.9:GFP*, dimostra chiaramente che l'espressione del reporter è confinata alle cellule di guardia stomatiche, risultando il segnale assente da ogni altro tipo cellulare (FIGURA 6).

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1 - Anatomia e funzionalità degli stomi

Fotografie al microscopio ottico di stomi di *Arabidopsis* presenti sulla

superficie fogliare (barra = 5 μ m). Gli stomi presenti sull'epidermide della maggior parte degli organi aerei delle piante terrestri sono costituiti da due cellule di guardia (g) altamente specializzate. Variazioni di turgore delle cellule di guardia determinano l'apertura (pannello A) o la chiusura (pannello B) della rima stomatica.

FIG. 2 - *Costrutti utilizzati per l'analisi del promotore di AtMYB60.*

- (A) Rappresentazione schematica della regione genomica contenente il gene *AtMYB60*. Sono rappresentati la porzione terminale dell'ultimo esone del gene At1g08820, i tre esoni della regione codificante di *AtMYB60* (At1g08810), e la porzione iniziale del primo esone del gene At1g08800.
- (B) Rappresentazione schematica dei costrutti contenenti i geni reporter GUS o GFP posti sotto il controllo di diverse porzioni della regione intergenica tra At1g08820 e *AtMYB60*. Il costrutto *p1.3-2.2:GUS* contiene inoltre l'intera regione intergenica compresa tra *AtMYB60* e At1g08800, inserita a valle del reporter GUS. Le cifre riportate in figura indicano il numero di paia di basi (bp) delle diverse regioni genomiche utilizzate.

FIG. 3 - *Espressione stoma-specifica del reporter GUS in plantule di linee trasformate con il costrutto p1.3-2.2:GUS*

A: espressione del reporter GUS in plantule di 4 giorni. La colorazione è presente soltanto nelle cellule di guardia degli stomi in cotiledoni (c) ed ipocotile (i). Nessun segnale è riscontrabile nella radice (r);

B: particolare di un cotiledone;

C: particolare dell'epidermide di una fogliolina in una plantula di 7 giorni.



FIG. 4 - *Espressione stoma-specifica del reporter GUS in piante adulte di linee trasformate con il costrutto p1.3-2.2:GUS*

A: espressione del reporter GUS in foglie di piante adulte di 7 settimane;

B: particolare di una foglia;

C: particolare di uno stelo;

D: infiorescenze mature. La colorazione GUS è presente soltanto negli stomi presenti sui sepali;

E: fiore maturo. La colorazione GUS è presente soltanto negli stomi di sepali, antere e pistillo;

F: particolare di un pistillo;

G: particolare di un'antera.

FIG. 5 - *Espressione stoma-specifica del reporter GUS in piante adulte di linee trasformate con i costrutti p1.3:GUS, p0.6:GUS, p0.2:GUS*

Esempi di colorazione rilevati in linee trasformate con i diversi costrutti:

A, B: plantule di 4 giorni;

C, D: foglie della rosetta;

E: stelo;

F: fiore maturo.

FIG. 6 - *Espressione stoma-specifica del reporter GUS in piante adulte di linee trasformate con il costrutto p0.9:GFP*

A: espressione del reporter GFP in foglie di piante adulte di 7 settimane (barra = 1 μ m);

B: espressione del reporter GFP in steli analizzati al microscopio confocale (barra = 20 μ m);

C: particolare di uno stoma della foglia analizzato al microscopio confocale (barra = 2 μm).

FIG. 7 - *Sequenza nucleotidica del promotore di AtMYB60 - SEQ ID N. 1.*

MATERIALI E METODI

Crescita delle piante

Per la crescita in piastra, i semi sono stati sterilizzati come segue: 5 min in etanolo assoluto, 5 min in ipoclorito di sodio 0,6% (v/v), Tween 20 0,05%, 2 lavaggi in acqua sterile. I semi sono stati poi risospesi in una soluzione di agarosio sterile 0,1% e germinati in piastre Petri su terreno MS (Sigma M-5519) agarizzato 0,7%, addizionato con saccarosio 1%, pH 5,7. Le piastre sono state stratificate per 4 giorni a 4°C al buio per favorire la germinazione uniforme e trasferite a 22°C con un fotoperiodo di 16 h di luce (48 $\mu\text{E}/\text{m}^2$) e 8 h di buio per la crescita.

Per la crescita in terra, i semi sono stati stratificati a 4°C al buio per 4 giorni e successivamente fatti germinare direttamente in terreno Einheitserde (tipo VM, Manna-Italia) in vaschette Araflat (Arasystem, Betatech, Belgio) o in comuni vasetti, con un fotoperiodo di 16 h di luce (48 $\mu\text{E}/\text{m}^2$) e 8 h di buio.

Estrazione DNA genomico

Alcune plantule cresciute in piastra o foglie e fiori da piante cresciute in terra sono stati trasferiti in provette Eppendorf e congelati in azoto liquido. I tessuti sono stati macinati direttamente nei tubi, per mezzo di una punta di plastica montata su di un trapano da banco, in presenza di 500 μl di buffer di estrazione (urea 7 M, Na_2SO_4 350 mM, Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 8 mM, sarkosyl 34 mM). È stato quindi aggiunto un ugual volume di fenolo cloroformio (1:1 v:v) e, dopo un passaggio su vortex, i campioni sono stati

centrifugati per 5 min a 13,000 rpm. Il surnatante è stato trasferito in tubi puliti cui sono stati aggiunti 400 µl di acqua distillata e 0,7 volumi di isopropanolo. Il DNA è stato precipitato centrifugando i campioni per 10 min a 13,000 rpm. L'isopropanolo è stato rimosso ed il pellet ottenuto è stato lavato con 300 µl di etanolo 80%. Dopo aver rimosso l'etanolo, il DNA è stato risospeso in 40 µl di Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, 20 µg/ml. Sono stati aggiunti 2 µl di RNasi A 20 µg/ml (Boehringer) ed i campioni sono stati incubati per 30 min a 37°C. Il DNA estratto è stato conservato a -20°C.

Amplificazione regioni genomiche 5' e 3' di AtMYB60

Per l'amplificazione delle diverse porzioni della regione genica a monte di AtMYB60 è stato utilizzato il primer P60R5NEW (5'-TCGGATCCTCTAGATCTCTCTG-3') in combinazione con i primers indicati nella tabella successiva. Nel primer P60R5NEW è stato introdotto un sito di restrizione BamHI (GGATCC)

Primer	Sequenza 5'-3'	Regione amplificata con P60F1	Costrutto
P60F1	<u>AAGCTT</u> CACAAGGACACAAGGACA	1291bp	<i>p1.3:GUS</i> <i>p1.3-2.2:GUS</i>
P60F8	ATAGAATCTAACACTACTAATTGTTAT	999bp	<i>p0.9:GFP</i>
P60F2bis	<u>AAGCTT</u> CAAGTTGCAGTGAATGA	603bp	<i>p0.6:GUS</i>
P60F3	<u>AAGCTT</u> CGTGTGGAGATCAACAT	246bp	<i>p0.2:GUS</i>

La sequenza AAGCTT rappresenta il sito di restrizione HindIII inserito per facilitare il clonaggio dei frammenti genomici.

La regione genomica 3', di 2219bp è stata amplificata utilizzando i primers 60-3'UTRF2 (5'-CACTTGATGGAGCTCTCTAATATG-3') e

60-3'UTRR1 (5'-CTGCAGACGTTTGTCTAGTAG-3').

Le reazioni di PCR sono state effettuate usando 0,5 µg di DNA genomico in una miscela di reazione contenente Red Taq PCR Reaction Buffer 1X (Sigma), dATP, dCTP, dGTP e dTTP ciascuno 5 mM, primers ciascuno 25 µM, RED TaqTM polymerase (Sigma) 1 unità e acqua distillata sterile per un volume finale di 25 µl. La reazione di amplificazione è stata condotta alle seguenti condizioni: 94°C per 1 min; 40 cicli di 94°C per 15 sec, 15 sec alla temperatura di annealing specifica per la coppia di primers utilizzata, 72°C per 1 min; 72°C per 10 min. I prodotti di reazione sono stati separati per elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) in TBE 1X (Tris-base 89 mM, H₂BO₃ 89 mM, EDTA 2 mM pH 8) e analizzati al transilluminatore UV. Le bande ottenute sono state excise dal gel di agarosio e purificate mediante Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), secondo le istruzioni fornite dal manuale del produttore.

Costituzione dei costrutti contenenti le fusioni delle diverse regioni genomiche con i geni reporter

Costrutto p0.9:GFP

Il frammento genomico di 999bp è stato clonato nel vettore pCRII-TOPO (Invitrogen), in accordo alle indicazioni della ditta produttrice. Tale frammento è stato poi exciso mediante taglio con EcoRI e le sue estremità rese non-coesive mediante trattamento con Klenow (Roche), seguendo le indicazioni del produttore. Il frammento così ottenuto è stato inserito nel vettore binario pBIN mGFP-ER, contenente il reporter GFP, preventivamente digerito con HindIII e trattato con Klenow.

Costrutto p1.3-2.2:GUS

Il frammento genomico di 1291bp è stato clonato nel vettore



pCR4-TOPO (Invitrogen), in accordo alle indicazioni della ditta produttrice. Il frammento è stato poi exciso con taglio HindIII, BamHI e clonato nei siti HindIII, BamHI del vettore binario pBI101.3 (Stratagene), contenente il reporter GUS, per produrre il vettore *p1.3:GUS*. Il frammento genomico corrispondente alla regione 3' di *AtMYB60*, di 2219bp è stato inserito nel vettore pCRII-TOPO e successivamente exciso con taglio EcoRI. Il frammento EcoRI è stato poi inserito nel sito EcoRI presente a valle del terminatore della trascrizione nel vettore *p1.3:GUS*, per dare origine al vettore *p1.3-2.2:GUS*.

Costrutto p0.6:GUS

Il frammento genomico di 603bp è stato clonato nel vettore pCR4-TOPO (Invitrogen), in accordo alle indicazioni della ditta produttrice. Il frammento è stato poi exciso con taglio HindIII, BamHI e clonato nei siti HindIII, BamHI del vettore binario pBI101.3 (Stratagene).

Costrutto p0.2:GUS

Il frammento genomico di 246bp è stato clonato nel vettore pCR4-TOPO (Invitrogen), in accordo alle indicazioni della ditta produttrice. Il frammento è stato poi exciso con taglio HindIII, BamHI e clonato nei siti HindIII, BamHI del vettore binario pBI101.3 (Stratagene).

Trasformazione delle piante

Piante di *Arabidopsis thaliana* wild-type appartenenti all'ecotipo Columbia, cresciute a 22°C con fotoperiodo di 16 h luce/8 h buio sono state utilizzate per la trasformazione. Per incrementare la produzione di semi sono state rimosse le infiorescenze primarie e le piante sono cresciute ancora per 5-6 giorni, finché sono comparse le infiorescenze secondarie. Poco prima

della trasformazione sono state eliminate tutte le silique. Le piante sono state poi trasformate con *Agrobacterium* ceppo GV3101 mediante "floral-dip", seguendo il protocollo di Clough e Bent (Clough and Bent, Plant J., 1998, 16:735-743).

I semi T1 sterilizzati delle piante transgeniche sono stati stratificati a 4°C al buio per 4 giorni e successivamente germinati, su terreno MS (Sigma M-5519), addizionato di bacto-agar (Difco 0141-01) 0,8%, pH 5,7 con 100 µg/ml di kanamicina. Le piante sono cresciute a 22°C, con fotoperiodo di 16 h luce/8 h buio.

Saggio GUS

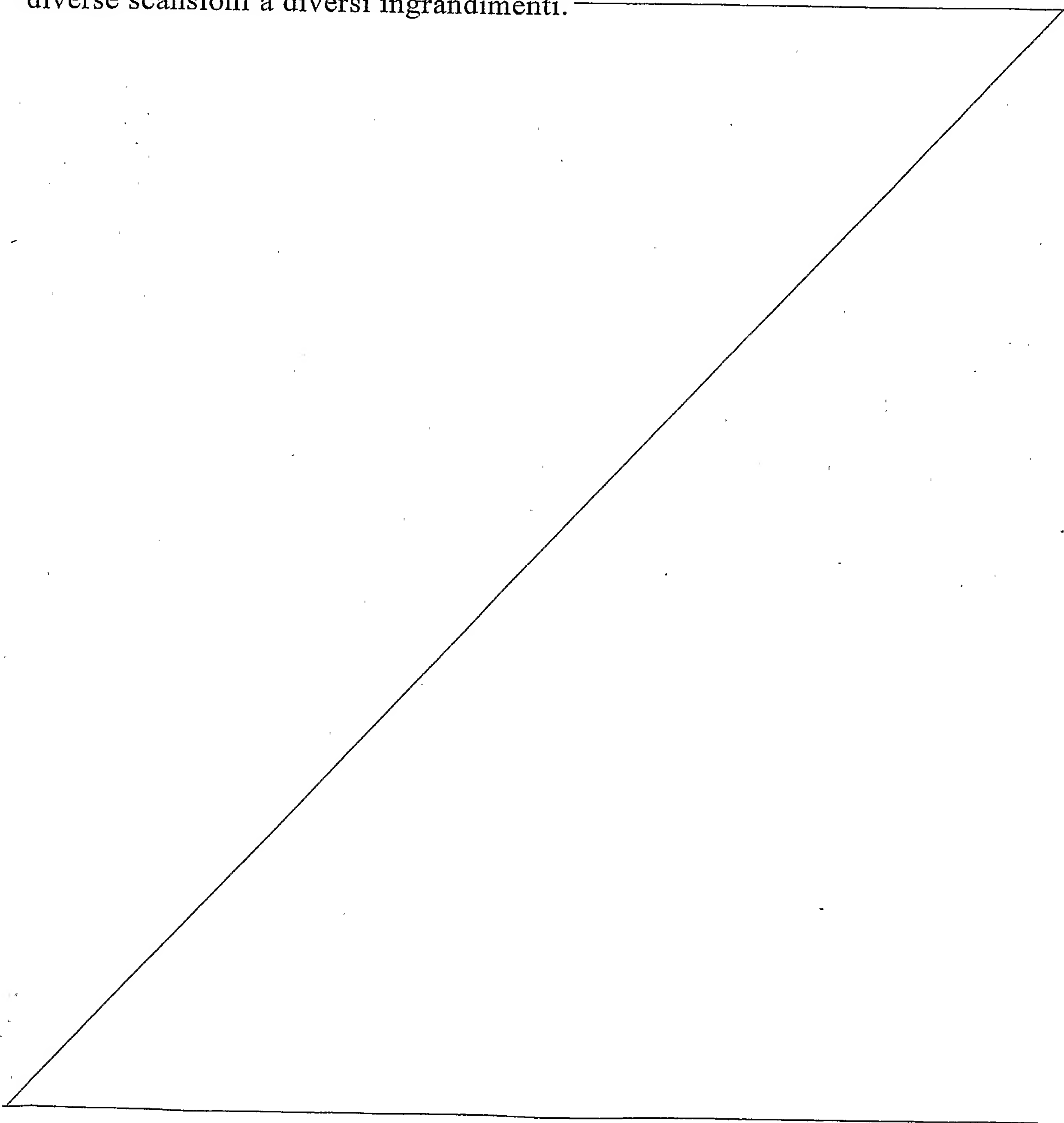
Plantule, foglie della rosetta e cauline, steli, infiorescenze e silique da analizzare per l'espressione del gene reporter GUS sono state trasferite nei pozzetti di una piastra microtiter, contenenti 2,0 ml di soluzione di colorazione GUS (100 mM di fosfato di sodio a pH 7,0, 0,1% di Triton X-100, 1 mg/ml di X-Gluc, ferricianide 0,5 mM). Il microtiter è stato posto in un essiccatore a vuoto per 10 min prima di essere incubato a 37°C, per tutta la notte, al buio. La soluzione di colorazione GUS è stata quindi rimossa e i tessuti sono stati decolorati con più passaggi in etanolo assoluto per un'ora, fino a decolorazione avvenuta. I tessuti decolorati sono stati conservati a -20°C in etanolo 70%.

I profili di espressione del gene reporter sono stati valutati mediante osservazione allo stereoscopio OLYMPUS SZX12 (ingrandimenti da 7X a 90X).

Analisi al microscopio confocale

I campioni per le analisi al microscopio confocale sono stati prelevati, appoggiati su di un vetrino portaoggetti al quale era stata applicata una

mascherina COVERWELL PERFUSION CHAMBER OBLONG (Sigma) e coperti da una soluzione di gelrite (GELRITE GELLANGUM Sigma) allo 0,3%, 1% di saccarosio ed $\frac{1}{2}$ MS a pH 5,8. Il tutto è stato poi coperto con un vetrino coprioggetti. L'analisi è stata effettuata con un microscopio confocale laser LEICA modello TCS NT con laser di Argon-Krypton accessorizzato con un filtro per la GFP (eccitazione 488 nm, emissione 519 nm), eseguendo diverse scansioni a diversi ingrandimenti.



RIVENDICAZIONI

1. Costrutto genico contenente il promotore SEQ ID N. 1, una sua parte o una sua variante con identità di sequenza di almeno l'80%, funzionalmente legato a una sequenza di acido nucleico (eterologo) diversa dal gene di *Arabidopsis AtMYB60*.
2. Costrutto genico secondo la rivendicazione 1, contenente la sequenza compresa tra i nucleotidi 1091-1291 di SEQ ID N. 1.
3. Costrutto genico secondo la rivendicazione 2, contenente la sequenza compresa tra i nucleotidi 1041-1291 di SEQ ID N. 1.
4. Costrutto genico secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido nucleico eterologo codifica una proteina o un trascritto di RNA antisenso.
5. Costrutto secondo la rivendicazione 4, in cui la proteina o l'RNA antisenso sono coinvolti nella via di segnalazione intracellulare modulata dall'acido abscissico.
6. Vettore d'espressione contenente un costrutto genico secondo le rivendicazioni 1-5.
7. Vettore d'espressione secondo la rivendicazione 6, scelto tra plasmidi, cosmidi, batteriofagi, virus, vettori per il trasferimento diretto di DNA o mediato da *Agrobacterium*.
8. Vettore binario per il trasferimento genico mediato da *Agrobacterium* secondo la rivendicazione 7.
9. Pianta mono- o dicotiledone contenente un vettore o un costrutto genico secondo le rivendicazioni 1-8.
10. Uso di un costrutto genico secondo le rivendicazioni 1-7 o di un vettore secondo le rivendicazioni 6-8 per l'espressione selettiva in cellule di guardia.



degli stomi di un gene eterologo.

11. Uso secondo la rivendicazione 10, dove detto gene eterologo è coinvolto nella regolazione dello stato di apertura o chiusura degli stomi.

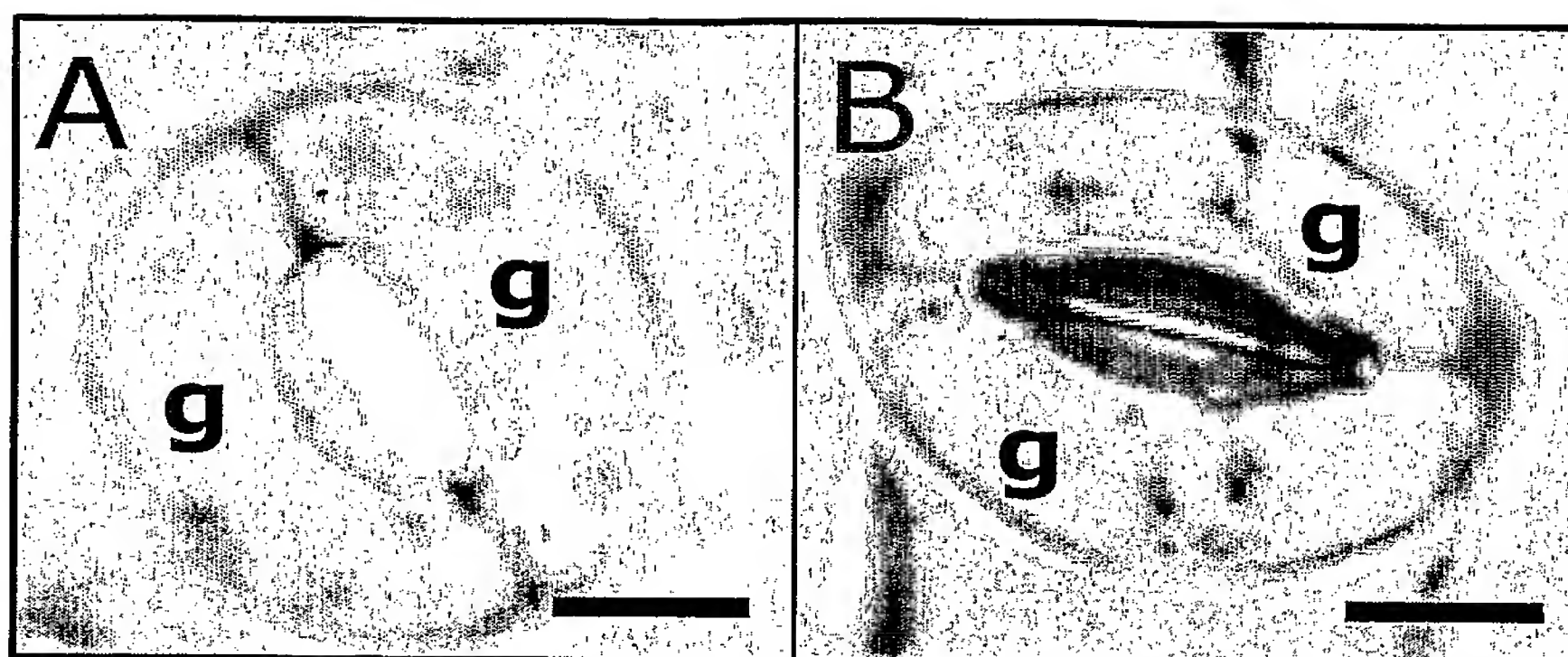
12. Metodo per regolare l'espressione di un gene diverso da *AtMYB60* in una pianta, che comprende l'introduzione in detta pianta, in una sua parte vegetativa o riproduttiva, in una qualsiasi fase di crescita, di un costrutto genico secondo le rivendicazioni 1-7 o di un vettore secondo le rivendicazioni 6-8.

Milano, 27 febbraio 2004

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



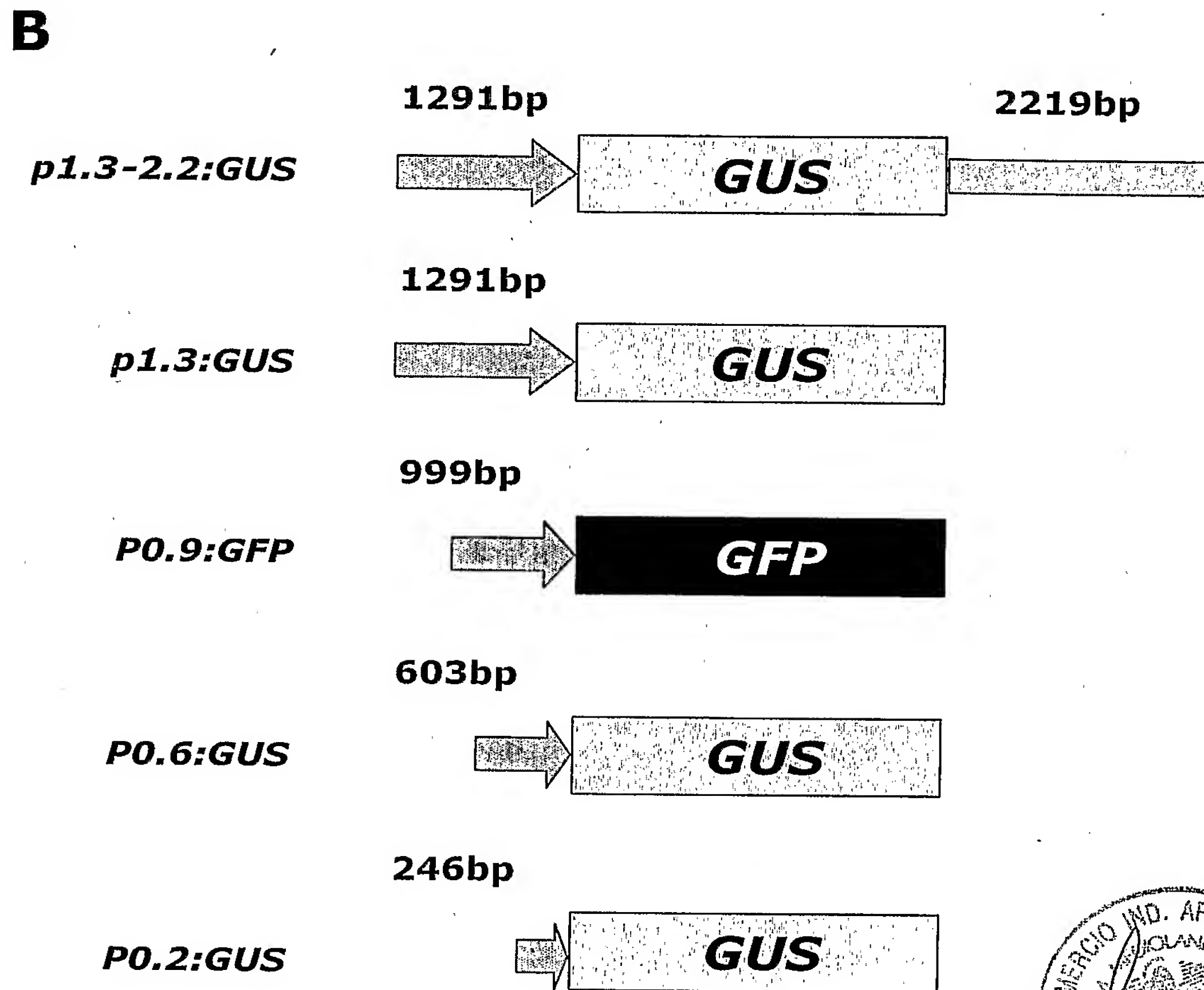
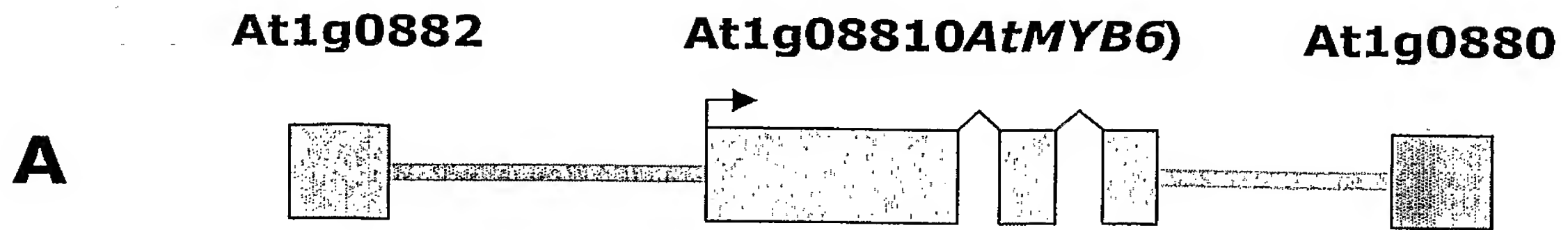
FIGURA 1



MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

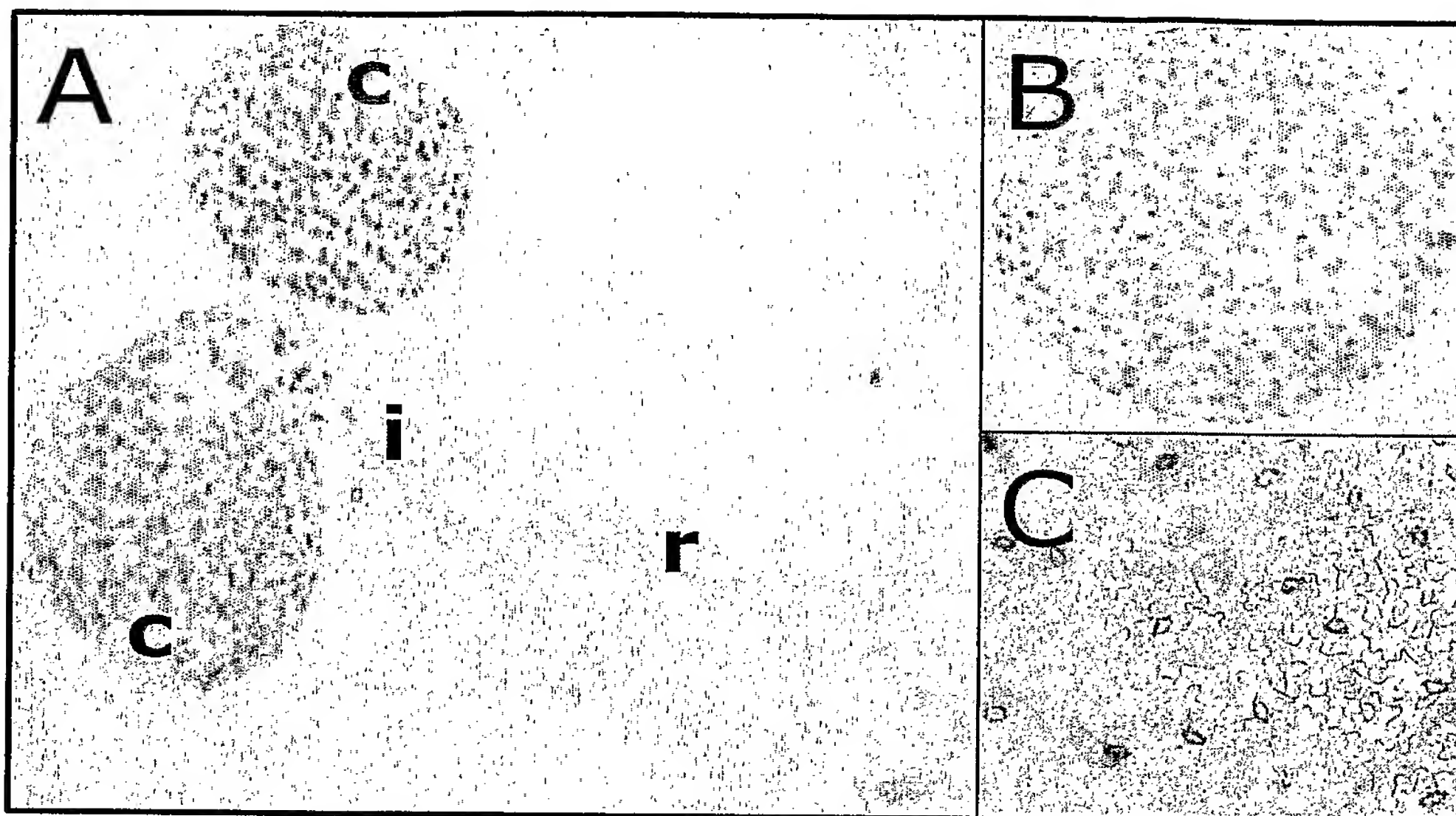
FIGURA 2



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

FIGURA 3



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

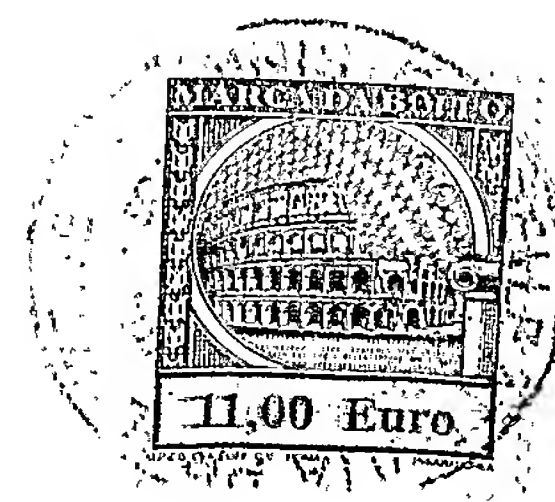
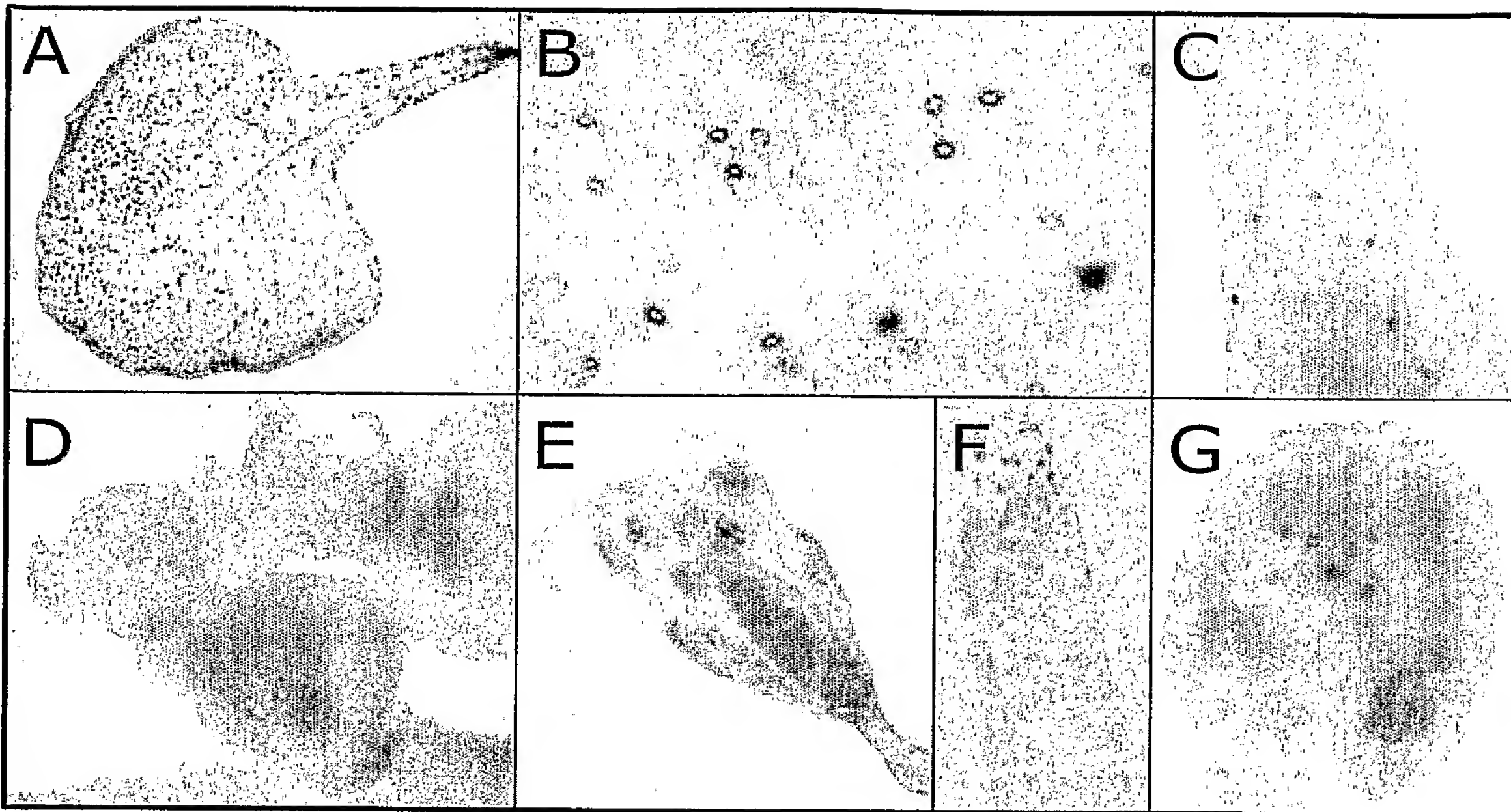
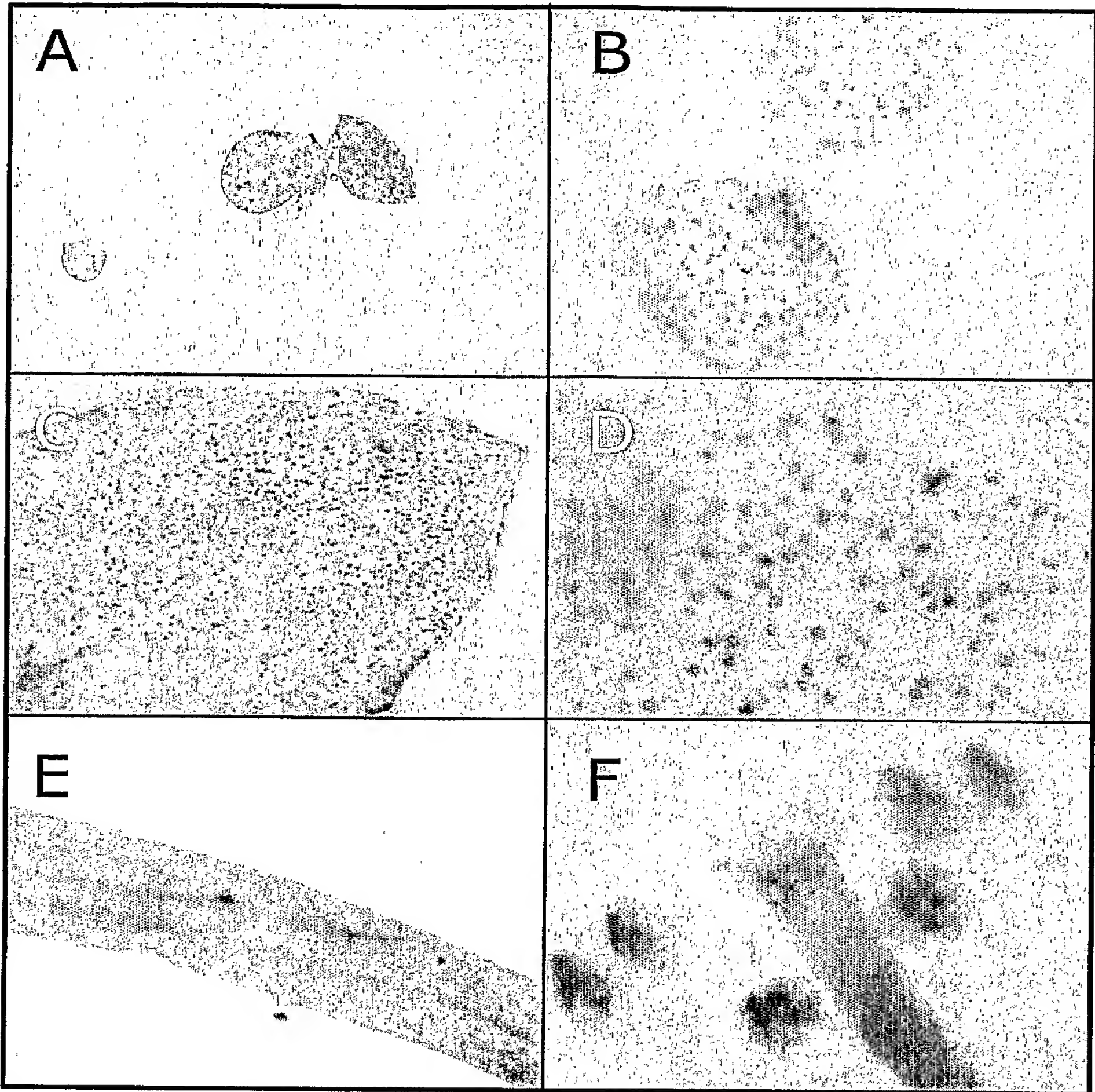


FIGURA 4



MI 7004 A000363
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

FIGURA 5

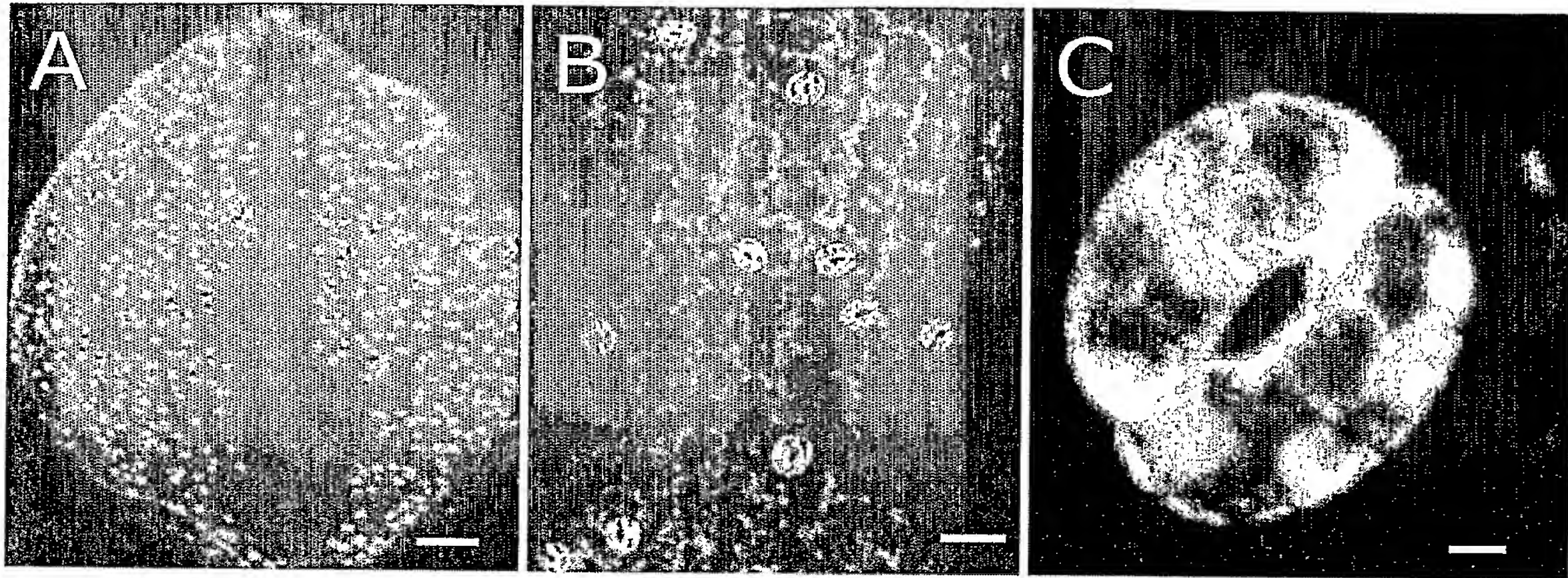


Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

A handwritten signature, likely of Banfi Paolo, written in dark ink.

FIGURA 6



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

MI 2004 A 0 0 0 3 6 3



FIGURA 7

5'-aacaaggacacaaggacatatggtatgatgatatgcttggtttctctgcttcttactaatttgaagc
tggttgattgatttgtctcttcttacgttcccttcttttttttctgcttcttcttctgctatagaccaggca
ggggctagggcctagtgatgggtattggccaatactattgggttatttgcctgggttattatttcgat
tttaggttaattcaattttaagaatacgtagatttggttggtttagtttggtttggttgcactaagttcg
gttttacataaatagaatctaactactaattgttatacgtaaaatacaacaataacagatttt
tcgtttcaattttcgtttaagagggttagacatttggtttggtttggttcattttttttccctttcaaatt
cacatccttcacgtagatgacaaaataaagaaaaacatgaatgaaagttgtaacttgtaagcatca
acatggaaatcatatcacaaagaacacaaatctaactaatgggtctttcacatattggtataattat
aagttgtaagaatattagtttaaacagaggcaacgagagatgcgtgatatatgaaaagttgaaaac
aaaagacatggatctaaagagtcaagcaaaatgtaatatcttttttcttctaaacttgaggatgtcc
aagttgcagtgaatgattccctttaatcatggagaaattcaatgaaataattgtgtttcttcccacact
ttatctttattttattttcttaccacaattacaactattatcacaaaaatgtaagtaacatagcttgtgac
tcttcttccatttatgagttgattatcactatatttataagtaattaccaacgaatgttccaaattaagc
aaaatattgtaatcgatacactatgtattcatctacaatatgttaacgagctccttttatggaaatatt
tcgattgaaaaaacatttgatggatcggttactaaataaataatccagtaacgtttcttaagggag
atatacatattcgtgtggagatcaacatatcttcgttaattgactacgcaaaatagttaatggaaaa
ggcagagtgactcgtgagcttggcagatccaaaagagggtgtcaagaaaaagcagatttaaaag
ttcttccctcttcttaagtcaaccattaatttcacatatatgtacatacatgttgcatttaactcatatac
atacatattctcacatctataaagagagcataagactcagagagatctagagga-3'



MI 2004 A 0 0 0 3 6 3

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

